

PCT/JP2004/009664

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

26.07.2004

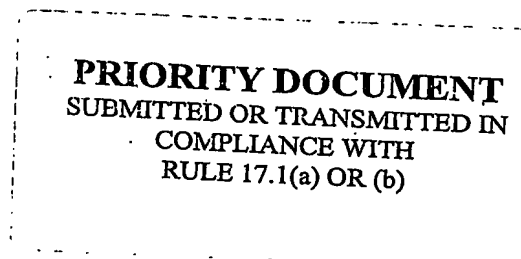
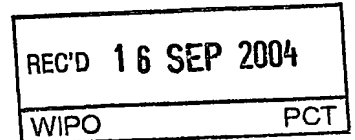
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2004年 1月 5日

出 願 番 号
Application Number: 特願2004-000535
[ST. 10/C]: [JP2004-000535]

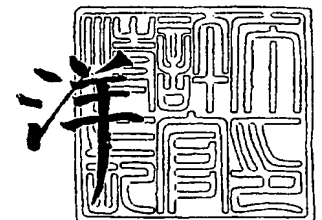
出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所



2004年 9月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特2004-3078859

【書類名】 特許願
【整理番号】 418T03052
【提出日】 平成16年 1月 5日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
C12P 21/00

【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市宮城野区苦竹四丁目 2 番 1 号 独立行政法人産業技術総合研究所東北センター内
【氏名】 水上 富士夫

【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市宮城野区苦竹四丁目 2 番 1 号 独立行政法人産業技術総合研究所東北センター内
【氏名】 清住 嘉道

【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市宮城野区苦竹四丁目 2 番 1 号 独立行政法人産業技術総合研究所東北センター内
【氏名】 川合 章子

【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市宮城野区苦竹四丁目 2 番 1 号 独立行政法人産業技術総合研究所東北センター内
【氏名】 長瀬 多加子

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市中別府 5 9 0 - 1 4 2
【氏名】 坂口 謙吾

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市保土ヶ谷区今井町 5 1 5 - 6
【氏名】 知久 浩之

【特許出願人】
【識別番号】 301021533
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代理人】
【識別番号】 100102004
【弁理士】
【氏名又は名称】 須藤 政彦
【電話番号】 03-5202-7423

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

高次構造が無秩序なため、不活性であるタンパク質の高次構造を整え、活性にする、タンパク質の機能賦活（リフォールディング）操作・工程で用いる試剤キットであって、BEA構造のゼオライト（ゼオライトベータ）からなるリフォールディング剤を構成要件として含むことを特徴とするタンパク質リフォールディングキット。

【請求項 2】

キットが、上記ゼオライトベータからなるリフォールディング剤、タンパク質変性剤及びpH調整剤を基本構成成分とし、更に、タンパク質S-S架橋形成防止剤、界面活性剤及びリフォールディング因子のうちの1種又は2種以上を含む組み合わせから構成されることを特徴とする請求項1記載のリフォールディングキット。

【請求項 3】

ゼオライトベータの骨格構造が、ケイ素、酸素及びそれ以外の1種又は2種以上の元素を含むことを特徴とする請求項1又は2に記載のリフォールディングキット。

【請求項 4】

ゼオライトベータの骨格構造が、ケイ素と酸素、又はケイ素とアルミニウムと酸素のみからなることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載のリフォールディングキット。

【請求項 5】

ゼオライトベータが、アンモニウム類を含むことを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載のリフォールディングキット。

【請求項 6】

アンモニウム類が、アンモニウムイオン、有機アミン及び／又は酸アミドであることを特徴とする請求項5に記載のリフォールディングキット。

【請求項 7】

有機アミンが、テトラアルキルアンモニウムであることを特徴とする請求項6に記載のリフォールディングキット。

【請求項 8】

キット中のタンパク質変性剤が、塩酸グアニジンであることを特徴とする請求項2から7のいずれかに記載のリフォールディングキット。

【請求項 9】

キット中のpH調整剤が、トリスアミノメタン三塩酸塩（TrisHCl）及び／又は4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニエタンスルホン酸（HEPES）であることを特徴とする請求項2から8のいずれかに記載のリフォールディングキット。

【請求項 10】

キット中のタンパク質S-S架橋形成防止剤が、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、シスチン又はチオフェノールであることを特徴とする請求項2から9のいずれかに記載のリフォールディングキット。

【請求項 11】

キット中の、界面活性剤及びリフォールディング因子が、ポリエチレングリコール、Ficoll70、Ficoll400、ポリ燐酸、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、スクロース、グルコース、グリセロール、イノシトール、シクロデキストリン、アミロース、Dextran T-500、Tween20、Tween40、Tween60、NP-40、SB3-14、SB12、CTAB及びTritonX-100のうちの1種又は2種以上から選ばれることを特徴とする請求項2から10のいずれかに記載のリフォールディングキット。

【請求項 12】

キットが、HEPES、ハロゲン化アルカリ、2-メルカプトエタノール、リフォールディング因子及び界面活性剤から構成される溶液（リフォールディングバッファー）、上記リフォールディング剤、塩酸グアニジン、TrisHCl及び2-メルカプトエタノールからなるキットであるか、又は、該リフォールディングバッファー、該リフォールディング剤、塩

酸グアニジン、TrisHCl、2-メルカプトエタノール及びハロゲン化アルカリからなるキットであることを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれかに記載のリフォールディングキット。

【書類名】明細書

【発明の名称】タンパク質巻き戻し用キット

【技術分野】

【0001】

本発明は、不活性タンパク質の機能賦活操作・工程に使用される試薬・物質・材料に関するものであり、更に詳しくは、高次構造が未形成なために、不活性なタンパク質、あるいは、ある種の原因で立体構造が変化し、失活したタンパク質をリフォールディングさせ、該タンパク質固有の、本来機能を賦活・再生させる操作・工程において用いられる試薬・物質・材料、いわゆる試剤キット、及び該キットを利用した不活性タンパク質の活性化、すなわち、活性タンパク質の製造・生産に関するものである。本発明は、従来、例えば、生化学品、医薬品製造の技術分野において、大腸菌等の遺伝子発現系を利用して生産した高次構造未形成タンパク質を、リフォールディングさせることが種々検討されているが、それらの多くは、実用上解決すべき種々の問題点を有していることを踏まえ、鎖長の長短を問わず、種々の高次構造未形成並びに変性・失活タンパク質に適用可能な、一般性、普遍性の高い、しかも、繰り返し使用可能な低コストで高効率のリフォールディングキットを開発し、提供することを可能にしたものであり、該タンパク質の本来の機能・活性を賦活させることが可能な新しいキット、並びに、それを用いる新しい機能賦活方法を提供するものとして有用である。従来、大腸菌等の発現系で得られるタンパク質は、一般には、立体構造が無秩序であり、該タンパク質の持つ本来の機能・物性を持たず、活性を示さないという問題があったが、本発明のキットは、上記タンパク質に代表される不活性タンパク質の機能・活性を賦活させ、所定の機能・活性を有するタンパク質へと再生させる、革新的なタンパク質製造・生産技術を提供するものである。

【背景技術】

【0002】

生体内で实际的に作用し、働くのは遺伝子ではなく、それらから作られるタンパク質である。したがって、タンパク質の機能・構造の解明・解析は、例えば、病気の治療や創薬に直結し、極めて重要である。このため、種々のタンパク質を様々な方法で合成・生産し、それらの構造を調べ、生体内における作用機構と役割を解明することが活発に行われている。そして、今や、タンパク質の機能は、それらを構成するアミノ酸の配列・鎖長のみならず、それらの取る秩序だった立体構造（高次構造）によって決まることは周知のこととなっている。

【0003】

タンパク質の合成は、一般には、大腸菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の発現系を用いて行われる。昆虫細胞や哺乳動物細胞による合成では、得られるタンパク質は、高次構造が制御され、秩序だった立体構造を取り、可溶性である場合が多い。しかし、これらの方法は、分離精製の操作が非常に煩雑であり、目的のタンパク質を得るまでに時間がかかり、コスト高となるばかりか、得られるタンパク質の量も極めて少ないという欠点がある。これに対して、大腸菌によるタンパク質合成は、操作が簡単で、目的タンパク質を得るのにさして時間を要せず、コストもさほどかからない。このため、現在は、目的タンパク質の合成を担う遺伝子コードを組み込ませた大腸菌を用いる方法が、タンパク質合成の主流となっており、生産プロセスも確立されつつある。

【0004】

ところが、ヒト等の高等生物のタンパク質を大腸菌発現系で合成した場合、アミノ酸の結合順序や数、すなわち、アミノ酸鎖長に関しては、設計どおりのタンパク質が得られるものの、その立体構造には秩序が無く、高次構造が制御されていないタンパク質、すなわち、アミノ酸鎖が纏れ絡まった、いわゆる封入体（インクルージョンボディ）と呼ばれる不溶性タンパク質が得られる。当然のことながら、この不溶性タンパク質のインクルージョンボディは、欲する機能・性能を持たず、活性を示さない。このため、大腸菌による生産プロセスでは、インクルージョンボディを解きほぐし、高次構造を整え、秩序だった立体構造を持つ可溶性タンパク質に変換する操作、すなわち、インクルージョンボディのリ

フォールディング（巻き戻し）が必要である。

【0005】

この種のリフォールディングは、大腸菌による生産タンパク質のみならず、熱履歴等の、ある種の原因で失活したタンパク質の再生にも応用でき、極めて重要な技術である。したがって、従来から、このリフォールディングは盛んに研究され、種々の方法が提案されているが、それらのほとんどは、リフォールディング率が低いうえに、ある限定されたタンパク質（特に、分子量の低い特定タンパク質）に対して偶発的に好ましい結果が得られたに過ぎないことが多く、現在、このリフォールディングは、種々のタンパク質に適用可能な、一般性、普遍性のある、しかも、リフォールディング率の高い効率的で経済的な方法とはなっていない。

【0006】

最も古くから良く用いられているリフォールディング操作は、透析や希釈である。前者は、タンパク質を界面活性剤や変性剤を含む水溶液に溶かし、これを界面活性剤や変性剤を含まない緩衝液で透析することで、界面活性剤や変性剤の濃度を下げて、タンパク質をリフォールディングするもの（Hampton Research社製 FoldItキット）である。一方、後者は、タンパク質を界面活性剤や変性剤を含む水溶液に溶かした後に、これを単に希釈して行くことで界面活性剤や変性剤の濃度を下げ、リフォールディングさせる（Hampton Research社製 FoldItキット）ものである。これらが一般であるが、その他にも、界面活性剤のSodium N-lauroyl sarcosinate溶液にグルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質を溶かし、それを1～2%のTriton X-100で希釈し巻き戻す（非特許文献1）方法等、希釈剤を用いてリフォールディングさせる方法もある。

【0007】

透析と希釈の両方に対し、Hampton Research社から使い捨てキットが市販されており、これらの操作法では、Ligand binding domains from glutamate and kainate receptors、Lysozyme、Carbonic anhydrase B等の極限られたタンパク質でリフォールディングが起こることが認められている（非特許文献2）に過ぎず、試行錯誤法の域にとどまっていると言っても過言ではない。したがって、たまたま上手くいった方法の場合でも、それを他のタンパク質に適用するとほとんどうまくいかないのが通例である。

【0008】

リフォールディングに吸着分離カラムを用いることも試されている。尿素・塩酸グアニジンで変性させたタンパク質、チオレドキシンをゲル濾過にかけると、ゲル濾過中にその巻き戻りが起こる（非特許文献3）。しかし、この方法では、リフォールディングは必ずしも十分ではなく、他のタンパク質では満足できる結果が得られないのが通常である。構造が壊れたタンパク質の巻き戻しを促進するタンパク質の一種である、分子シャペロンGroELを固定したカラムに、8Mの尿素で可溶化したタンパク質を吸着させ、塩化カリウムと尿素をそれぞれ2M含む溶液で溶離すると、溶離タンパク質の巻き戻りが起こることも報告されている（非特許文献4）。しかし、これらは、Cyclophilin A等、極めて限られたタンパク質で認められているに過ぎない。特に、分子シャペロンを用いる場合は、それがある種の鋳型であるために、その鋳型の形に適合しないものではまったく役に立たないというのが実情である。

【0009】

また、リフォールディング促進に関与すると考えられるタンパク質3種、GroEL、DsbA（大腸菌のdisulfide oxidoreductase）及びPPI（human proline cis-trans isomerase）を同時に固定した樹脂に、塩酸グアニジンで変性したタンパク質（Scorpion toxin Cn5）を混ぜると、このタンパク質の巻き戻りが樹脂上で起こる（非特許文献5）ことも報告されている。しかしながら、これについては、Scorpion toxin Cn5等の特定タンパク質にしかな適用できない欠点に加え、タンパク質3種を固定した樹脂の調製が煩雑でコスト高となるという問題もある。

【0010】

カラム上の固定物質として、巻き戻しタンパク質の代わりに金属キレートを用いる場合

もある。ニッケルキレートを固定した樹脂に、塩酸グアニジンと尿素を含む水溶液で溶解変性したHis6-タグ融合タンパク質を吸着させ、変性剤を含まない緩衝溶液で洗うと、該融合タンパク質の巻き戻りが起こる（非特許文献6）。本法の適用がこのタンパク質に限られることと、樹脂の調製が煩雑でコスト高となることは同じである。

【0011】

人工シャペロンとして、 β -シクロデキストリンやシクロアミロースを用い、このシャペロン溶液に界面活性剤で変性したタンパク質を混ぜると、界面活性剤の人工シャペロンによる取り込み除去が生じ、この過程でタンパク質が巻き戻るとの報告（非特許文献7～9）もある。しかし、この方法は、carbonic anhydrase B 等で成功しているに過ぎない。しかも、繰り返し行える方法ではなく、高コストである。

【0012】

【非特許文献1】 Anal. Biochem. Vol. 210 (1993) 179-187

【非特許文献2】 Protein Sci. Vol. 8 (1999):1475-1483

【非特許文献3】 Biochemistry, Vol. 26 (1987) 3135-3141

【非特許文献4】 Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94 (1997) 3576-3578

【非特許文献5】 Nat. Biotechnol. Vol. 17 (1999) 187-191

【非特許文献6】 Life Science News (Japan Ed.) Vol. 3 (2001) 6-7

【非特許文献7】 J. Am. Chem. Soc. Vol. 117 (1995) 2373-2374

【非特許文献8】 J. Biol. Chem. Vol. 271 (1996) 3478-3487

【非特許文献9】 FEBS Lett. Vol. 486 (2000) 131-135

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

このように、従来、種々のリフォールディングの方法や、リフォールディング機能を有する物質・材料が報告され、更には、それらから構成されるリフォールディングキットが市販されているが、これらの方法・物質材料並びにキットには、上記のような問題があるのが実情であり、そのために、当技術分野においては、鎖長の長短を問わず、種々の高次構造未形成並びに変性・失活タンパク質に適用可能な、一般性、普遍性の高い、しかも、繰り返し使用可能な低コストの高効率のリフォールディング物質材料並びに方法、すなわち、経済的で高性能なりフォールディング技術、並びにそれを基とするリフォールディングキットを開発することが急務の課題となっていた。

【0014】

このような状況下にあつて、本発明者らは、上記従来技術に鑑みて、上述の課題を解決することが可能な、新しいリフォールディング技術を開発することを目標として鋭意研究開発を進めると共に、DNA、RNA、タンパク質等のバイオポリマーの、ゼオライト等の金属酸化物上への吸着状況を詳細に調べ（Chem. Eur. J. Vol. 7 (2001) 1555-1560）、タンパク質の分離精製材料並びに方法を鋭意研究している過程で、BEA構造のゼオライト、すなわち、ゼオライトベータが変性タンパク質の巻き戻し機能を有することを見出し、ゼオライトベータからなるリフォールディング剤を開発すると同時に、それを必須構成成分とするタンパク質リフォールディングキットを開発するに至った。更に、該リフォールディング剤が、大腸菌等の発現系で生産した高次構造未形成タンパク質あるいは熱履歴等の、ある種の原因で失活したタンパク質等、分子量10万を越える大型のタンパク質を含む種々の立体構造無秩序タンパク質等の巻き戻しにも適用できることを認め、本発明、すなわち、一般性、普遍性の高いタンパク質のリフォールディング技術並びにリフォールディングキットを完成するに到った。本発明は、新規リフォールディングキットを提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0015】

上記課題を解決するための本発明は、以下の技術的手段から構成される。

(1) 高次構造が無秩序なため、不活性であるタンパク質の高次構造を整え、活性にする

、タンパク質の機能賦活（リフォールディング）操作・工程で用いる試剤キットであって、BEA構造のゼオライト（ゼオライトベータ）からなるリフォールディング剤を構成要件として含むことを特徴とするタンパク質リフォールディングキット。

（２）キットが、上記ゼオライトベータからなるリフォールディング剤、タンパク質変性剤及びpH調整剤を基本構成成分とし、更に、タンパク質S-S架橋形成防止剤、界面活性剤及びリフォールディング因子のうちの１種又は２種以上を含む組み合わせから構成されることを特徴とする上記（１）に記載のリフォールディングキット。

（３）ゼオライトベータの骨格構造が、ケイ素、酸素及びそれ以外の１種又は２種以上の元素を含むことを特徴とする上記（１）又は（２）に記載のリフォールディングキット。

（４）ゼオライトベータの骨格構造が、ケイ素と酸素、又はケイ素とアルミニウムと酸素のみからなることを特徴とする上記（１）から（３）のいずれかに記載のリフォールディングキット。

（５）ゼオライトベータが、アンモニウム類を含むことを特徴とする上記（１）から（４）のいずれかに記載のリフォールディングキット。

（６）アンモニウム類が、アンモニウムイオン、有機アミン及び／又は酸アミドであることを特徴とする上記（５）に記載のリフォールディングキット。

（７）有機アミンが、テトラアルキルアンモニウムであることを特徴とする上記（６）に記載のリフォールディングキット。

（８）キット中のタンパク質変性剤が、塩酸グアニジンであることを特徴とする上記（２）から（７）のいずれかに記載のリフォールディングキット。

（９）キット中のpH調整剤が、トリスアミノメタン三塩酸塩（TrisHCl）及び／又は４-（２-ヒドロキシエチル）-１-ピペラジンエタンスルホン酸（HEPES）であることを特徴とする上記（２）から（８）のいずれかに記載のリフォールディングキット。

（１０）キット中のタンパク質S-S架橋形成防止剤が、２-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、シスチン又はチオフェノールであることを特徴とする上記（２）から（９）のいずれかに記載のリフォールディングキット。

（１１）キット中の、界面活性剤及びリフォールディング因子が、ポリエチレングリコール、Ficoll170、Ficoll400、ポリ燐酸、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、スクロース、グルコース、グリセロール、イノシトール、シクロデキストリン、アミロース、Dextran T-500、Tween20、Tween40、Tween60、NP-40、SB3-14、SB12、CTAB及びTritonX-100のうちの１種又は２種以上から選ばれることを特徴とする上記（２）から（１０）のいずれかに記載のリフォールディングキット。

（１２）キットが、HEPES、ハロゲン化アルカリ、２-メルカプトエタノール、リフォールディング因子及び界面活性剤から構成される溶液（リフォールディングバッファー）、上記リフォールディング剤、塩酸グアニジン、TrisHCl及び２-メルカプトエタノールからなるキットであるか、又は、該リフォールディングバッファー、該リフォールディング剤、塩酸グアニジン、TrisHCl、２-メルカプトエタノール及びハロゲン化アルカリからなるキットであることを特徴とする上記（１）から（７）のいずれかに記載のリフォールディングキット。

【0016】

次に、本発明について更に詳細に説明する。

本発明の不活性タンパク質の機能賦活を行う試剤群、すなわち、リフォールディングキットの対象となるタンパク質は、高次構造が整っていない不活性なタンパク質全てであるが、一般には、大腸菌等の発現系で得られる立体構造が無秩序なタンパク質、いわゆるインクルージョンボディ、あるいは熱履歴等の、ある種の原因で失活したタンパク質である。本発明のキットは、該タンパク質の、該キット中のゼオライトベータからなるリフォールディング剤への吸着・脱離過程で、該タンパク質の立体構造をリフォールディングし、該タンパク質本来の機能の賦活・付与を行うが、該リフォールディング剤の本能力は、必ずしもそれに限定されるものではなく、通常、次のような操作で発揮される。換言すれば、次のような操作で不活性タンパク質の機能賦活が行われる。すなわち、この操作は、ま

ず、該タンパク質を、変性剤や界面活性剤等を含む溶液に分散溶解し、この後、該リフォールディング剤を含む溶液との混合や、該リフォールディング剤充填カラムへの注入により、該タンパク質を該リフォールディング剤に吸着させ、次いで、該リフォールディング剤から該タンパク質を脱着させる手順で行われる。

【0017】

該リフォールディング剤に吸着前のタンパク質の分散溶媒としては、一般には、それが大腸菌等の発現系で生産されること、タンパク質は、通常、水溶液中で使われることが多く、失活した場合でも水溶液中にあることが多いことから、好ましくは、水が用いられる。しかし、必ずしもこれに限定されるものではなく、該タンパク質と反応を起こさないもの、及び該タンパク質の立体構造を不本意な形に変えるものでなければ、基本的には問題はなく、このような場合は、それらの溶媒単独あるいは水と混合して用いることが可能である。この種の溶媒の典型例として、一価及び多価のアルコールやポリエーテル類を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0018】

該タンパク質の吸脱着は、一般には、インクルージョンボディ等の纏れ絡んだタンパク質鎖長を、解きほぐし易くし、また、巻き戻り易くするために、変性剤や界面活性剤、pH調整剤、リフォールディング因子等の存在下、及び／又は、タンパク質鎖長中に不本意に生成したS-S結合（架橋）を切断するために、ある種の還元剤の存在下で行われる。したがって、本発明のキットは、ゼオライトベータからなるリフォールディング剤の他、変性剤やpH調整剤を含み、更には、これらの他に、リフォールディング剤からのタンパク質の脱着促進と、リフォールディング後の再インクルージョンボディ化を防ぐためのリフォールディング因子及び／又は界面活性剤、S-S架橋形成防止（阻害）剤から、構成されている。

【0019】

本発明のキット中の、この種の変性剤やpH調整剤の典型例としては、例えば、それぞれ、塩酸グアニジンや、トリスアミノメタン塩酸塩（TrisHCl）及び4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジンエタンスルホン酸（4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid：HEPES）等を挙げることができるが、これらに留まるものではなく、同様な作用を持つものはいずれも使用可能である。

【0020】

また、本発明のキット中の、リフォールディング因子や界面活性剤の典型例としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG20K、PEG800、PEG200、PEG3350）、Ficoll170、Ficoll1400、ポリリン酸、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、スクロース、グルコース、グリセロール、イノシトール、シクロデキストリン、アミロース、Dextran T-500、Tween20、Tween40、Tween60、NP-40、SB3-14、SB12、CTAB及びTritonX-100等を挙げることができるが、これらに限定されるものではなく、同様な作用を持つものはいずれも使用可能である。

【0021】

不本意に生成したS-S架橋を切断し、本来の構造に戻す還元剤としては、安価で入手し易いことから、通常は、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、シスチンあるいはチオフェノールが用いられるが、これらに限定されるものではなく、同様な作用を行うものは全て使用可能である。

【0022】

当然のことながら、タンパク質鎖長が解きほぐれやすい場合や、不本意にS-S架橋が生成しない場合は、変性剤や界面活性剤、及び／又は防止剤を必ずしも使う必要がないので、これらの存在は常に必須とは限らず、状況に応じ適宜選択してキットとして用いられる。また、キットを構成する成分の量は、それを用いるときの状況に応じ適宜決められることになるが、本発明のキットは、通常は、ゼオライトベータからなるリフォールディング剤、塩酸グアニジン（変性剤）及びTrisHClとHEPES（pH調整剤）を有し、更に、2-メルカプトエタノールと前記リフォールディング因子や界面活性剤の1種あるいは2種以上より構成されのが好ましい。

【0023】

一般に、本キットを用いてのリフォールディング操作・工程中のタンパク質の脱着過程では、通常、該キット中の試剤（リフォールディング因子や界面活性剤）による置換吸着が用いられるが、基本的には、該タンパク質の脱着後の機能賦活を阻まない操作であればいかなる操作も適用可能であり、特に限定されるものではない。したがって、pH変化、温度変化等も用いることができる上に、これらと置換吸着を併用することもできる。

【0024】

ところで、置換吸着の際、該タンパク質の脱着を促す物質として、従来から、カラムクロマトグラフィーの溶離では、ハロゲン化アルカリ等の塩が頻繁に用いられており、これらの併用で顕著な効果が得られる場合も多い。また、本発明のキット構成試剤を用いる時に、キット構成試剤間の反応等、特に問題や支障が起きない場合は、キット構成試剤の幾つかをあらかじめ合わせておき、一つの試剤としておくこともできる。例を挙げれば、HE PES、ハロゲン化アルカリ（例えば、塩化ナトリウム）、2-メルカプトエタノール、リフォールディング因子（例えば、ポリエチレングリコールのPEG20K、PEG800、PEG200、PEG3350のうちの1種や、Ficoll70あるいは β -シクロデキストリン）及び界面活性剤（例えば、Tween20、Tween40、Tween60、NP-40あるいはTritonX-100）からなる溶液をリフォールディングバッファーとして一纏めにし、本発明のキット構成試剤の一つにすることも可能である。これは、リフォールディング操作・工程でしばしば大きな利便となる。

【0025】

更に言えば、該タンパク質の該キット中のリフォールディング剤への吸着、あるいはそれからの脱着を促すために、上記操作と併用して種々の付加的操作を行うこともできる。このような操作の典型例には、例えば、超音波やマイクロ波の照射や、磁場や電場の印加がある。以上述べてきた、本発明のキットを用いての手順・操作により、該リフォールディング剤の持つタンパク質巻き戻し能が高度に発揮されることになり、大腸菌等の発現系を用いて生産した高次構造未形成タンパク質、並びに、ある種の原因で失活したタンパク質にリフォールディングが起き、それらのタンパク質が本来持つはずの機能が速やかに賦活される。

【0026】

以上述べてきた、不活性タンパク質の活性賦活機能・変性タンパク質の巻き戻し能を発揮するリフォールディング剤を構成するBEA構造のゼオライト、いわゆるゼオライトベータとしては、典型例として、例えば、通常の市販ゼオライトベータ（例えば、商品名HSZ-930NHA、東ソー社製）、文献等に従い自前で合成・調製したゼオライトベータ（Zeolites, Vol. 11 (1991) 202. 参照）、それらを、焼成して得られるゼオライトベータ、該ゼオライトの有する空間中に、アンモニウムや種々の脂肪族及び／又は芳香族アンモニウム等のアンモニウム類があるゼオライトベータ、該ゼオライトを形成する骨格ケイ素の一部が他の金属に変わった骨格置換ゼオライトベータ、前記アンモニウム含有骨格置換ゼオライトベータ等が挙げられるが、ゼオライトベータの骨格構造を持つものであれば、基本的には、全て該機能・能力を有しており、該リフォールディング剤を構成するゼオライトベータは、ここに挙げたものに必ずしも限定されるものではない。

【0027】

ところで、該リフォールディング剤の該機能・能力は、不活性並びに変性タンパク質の該リフォールディング剤への接触、すなわち、吸着・脱離で発揮され、この際には、リフォールディング剤表面と対象タンパク質との間の親和性が重要となる上に、また、該タンパク質の吸着・脱離は、その分散溶媒、分散溶媒中の変性剤や界面活性剤並びにリフォールディング因子、更には、分散溶媒のpH等で影響される場合も多いので、対象とするタンパク質及びそれを含む溶液の成分状況等に応じて、該リフォールディング剤のリフォールディング能は、該リフォールディング剤を構成する前述の種々のゼオライトベータで、しばしば異なる。しかしながら、総じて、アンモニウム類を含むゼオライトベータより構成されるリフォールディング剤は、それを含まないものより高いリフォールディング能を示すので、該リフォールディング剤としては、アンモニウム類を含むゼオライトベータ及

びアンモニウム類を含む骨格置換ゼオライトベータからなるリフォールディング剤を用いる方が好ましいことがしばしばである。

【0028】

該リフォールディング剤を構成するゼオライトベータに含有されるべきアンモニウム類としては、該ゼオライトの有する空間中に留まり易いアンモニウム類、例えば、アンモニウムイオン、アルキル基がメチル、エチル、プロピル及びブチル等のモノ、ジ、トリ及びテトラアルキルアンモニウムイオン、更には、5員環、6員環及び7員環の脂肪族アミン及び芳香族アミンのアンモニウムイオン、より詳しくは、ピペリジウムイオン、アルキルピペリジウムイオン、ピリジニウムイオン、アルキルピリジニウムイオン、アニリンイオン、N-アルキルアニリンイオン等を挙げることができ、また、酸アミドとしての、例えば、フォルムアミド、アセトアミド及びこれらのN-アルキル置換体を挙げることができるが、基本的には、ゼオライトベータの有する細孔中に入ることが可能なアンモニウム類であればいずれでもよく、ここに例示したアンモニウム類に限定されるものではない。

【0029】

該リフォールディング剤を構成するゼオライトベータの骨格を形成する元素は、一般にはケイ素と酸素、あるいはケイ素とアルミニウムと酸素であるが、ケイ素やアルミニウムの一部が他の元素に置換したゼオライトベータ、及びその細孔中に前記アンモニウム類を含む置換ゼオライトベータも、不活性タンパク質の活性賦活機能を行うリフォールディング剤となり得る。該ゼオライトベータの骨格ケイ素と置換可能なものの典型としては、例えば、アルミニウム、ホウ素、燐、ガリウム、錫、チタン、鉄、コバルト、銅、ニッケル、亜鉛、クロム、バナジウム等を挙げることができるが、これらに留まるものではなく、基本的にゼオライトベータの構造を破壊しないものであればいずれでも良い。また、その置換量に関しても、ゼオライトベータの構造を破壊しない量であれば、置換量はいかなる量でもかまわず、該置換ゼオライトベータは、不活性並びに変性タンパク質のリフォールディング剤となり得ることは同様である。

【0030】

本発明のキットの必須成分である、リフォールディング剤を構成するゼオライトベータは、いずれも熱安定性、化学安定性に優れており、しかも、安価であるうえ、繰り返し使用が可能である。本発明のキット並びにそれを用いる不活性並びに変性タンパク質の機能賦活方法は、例えば、生化学品製造、医薬品製造にとって極めて有用であり、その技術的、経済効果は計り知れないものがある。

【発明の効果】

【0031】

本発明は、不活性タンパク質の機能を賦活する操作・工程に用いる試剤キット、並びにその使用方法に係わるものであり、本発明によって、1) タンパク質の種類を問わず広範な不活性タンパク質に対して、それらの本来の機能を賦活させる万能的試剤群、すなわち、キットを選定できる、2) このキットを用いて、前記タンパク質、例えば、大腸菌等の発現系で産生された高次構造が未形成なために不活性なタンパク質、あるいは、ある種の原因で立体構造が変化して失活したタンパク質を処理することにより、それらのタンパク質の本来の機能・活性をリフォールディングにより賦活させることができる、3) 本キットは、インクルージョンボディアのタンパク質にも効力を有し、これを用いるインクルージョンボディアの効率的なリフォールディング方法として有用である、4) 本キットを用いることによる不活性タンパク質の機能賦活方法は、タンパク質を構成するアミノ酸の鎖長・配列を問わず種々の変性タンパク質に適用可能な、一般性、普遍性のある、しかも、リフォールディング率の高い効率的な方法として提供される、5) 本キットの必須成分であるリフォールディング剤を構成するBEA構造のゼオライト、すなわち、ゼオライトベータは、低コストであり、しかも、繰り返し使用可能である、6) 本キットを用いる不活性タンパク質の機能賦活方法は、分子量10万を越える大型のタンパク質を含む種々の立体構造無秩序タンパク質のリフォールディングに適用できる、7) 例えば、大腸菌の発現系によるタンパク質合成プロセスと本キットによる不活性タンパク質の機能賦活とを組み合わせ

ることにより、高次構造が制御されて該タンパク質固有の本来機能が備わったタンパク質を生産する、新規の活性タンパク質製造プロセスを提案・確立することができる、という格別の効果が奏される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

次に、実施例及び比較例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例等によって何ら制約を受けるものではない。

【実施例】

【0033】

(実施例及び比較例)

以下、本実施例では、大腸菌発現系生産タンパク質及び変性タンパク質の機能賦活を例に説明するが、本発明の適用は、実施例に示されたタンパク質に限定・制限されるものではない。

【0034】

1) 試料等の調製

(a) リフォールディング剤

本発明のリフォールディング剤（機能賦活剤）として、後記する表1及び表2に示した、市販ゼオライトベータ、合成ゼオライトベータ、それらを焼成したゼオライトベータ、各種アンモニウム類含有ゼオライトベータ、骨格置換ゼオライトベータ及び各種アンモニウム類含有骨格置換ゼオライトベータを使用した。比較品として、表3の比較例に列挙した物質を用いた。これらの物質は、ベータ構造を有するゼオライトではない。例えば、比較例19、20のゼオライトは、合成時間が充分ではなく、BEA構造が未形成のシリカ及びシリカ・アルミナで、大半は非晶質構造である。

【0035】

(b) 変性タンパク質溶液

活性賦活対象タンパク質として、表1ないし表3のタンパク質及び同表の備考欄に示した内容のRP70（黄色ショウジョウバエ由来）、P53（ヒト由来）等を使用した。

(c) リフォールディングバッファー

一般には、リフォールディングバッファーとして、50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)% ポリエチレングリコール 20000（リフォールディング因子）/1(v/v)% Tween20（界面活性剤）の組成の液を用いた。表4ないし表6に、用いたリフォールディングバッファーの詳細を示す。

【0036】

2) リフォールディング操作

1.5mlのエッペンドルフチューブに100mgの機能賦活剤を入れ、0.5mlの6M塩酸グアニジン・20mM トリスアミノメタン三塩酸塩（TrisHCl）pH7.5・0.5M NaCl・20mM 2-メルカプトエタノールを加えて懸濁した。これに、6M塩酸グアニジン・20mM 2-メルカプトエタノールを加え、氷上で1時間放置し、変性したタンパク質溶液（濃度は0.5～1.0mg/ml）を0.5ml加えた。この混合液を、該タンパク質の機能賦活剤上への吸着を確実にするために、低温室に置かれたROTARY CULTURE RCC-100（IWAKI GLASS社製）で、1時間攪拌した。

【0037】

その後、10000×gで5秒間遠心して、機能賦活剤を沈殿させ、上澄みを除去した。次に、この沈殿した機能賦活剤からタンパク質変性剤を完全に除去するために、これを1mlの20mM TrisHCl pH7.5・20mM 2-メルカプトエタノールで4回洗った後、10000×gで5秒間遠心し、更に、生じた上澄みを捨てた。残った機能賦活剤に、1mlのリフォールディングバッファー（50mM HEPES pH7.5、0.5M NaCl、20mM 2-メルカプトエタノール、リフォールディング因子及び非イオン系界面活性剤から構成）を加え、懸濁した。

【0038】

機能賦活剤上に吸着した該タンパク質を脱着・溶離させるために、この懸濁液を再び低温下のROTARY CULTURE RCC-100（IWAKI GLASS社製）で攪拌した。その後、10000×gで5秒間

遠心して、機能賦活剤を沈殿させ、該タンパク質を含む上澄みを新しいエッペンドルフチューブに移し、活性測定（アッセイ）に用いた。

なお、活性測定には、用いたタンパク質の働きに応じた方法を採用した。具体的には、4種の測定、すなわち、ゲルシフトアッセイ、ポリメラーゼアッセイ、リゾチーム活性測定及びトポイソメラーゼI活性測定で行った。

【0039】

3) 活性測定操作

(a) ゲルシフトアッセイ

1pmolの放射性同位体で標識したオリゴヌクレオチドDNAとリフォールディングしたタンパク質を、組成25mM HEPES pH7.4・50mM KCl・20% glycerol・0.1% NP-40・1mM DTT・1mg/ml bovine serum albuminの溶液中で、氷上30分インキュベートし、4.5%のポリアクリルアミノゲルで0.5×TBEのバッファーを使い、4℃で電気泳動した。

タンパク質にDNA結合性がある（すなわち、活性がある）場合、DNAにタンパク質が結合し、これにより電気泳動が遅くなりバンドがシフトするので、これにより活性（すなわち、リフォールディング率）を判定した。

【0040】

(b) ポリメラーゼアッセイ

鋳型DNAとして、poly(dA)oligo(dT)₁₂₋₁₈あるいはDNase I-activate calf thymus DNAを使用し、反応液には、組成（終濃度）50mM TrisHCl pH7.5・1mM DTT・15% glycerol・5mM MgCl₂・0.5μM dTTP (cold)（チミジル酸三リン酸）・[³H]-dTTP (5mCi/ml: 100-500 cpm/pmol)のものをを用いた。まず、この反応液の濃度が2倍のもの10μlに、タンパク質（酵素）サンプル溶液を加え、懸濁した後、37℃で1時間インキュベートした後、氷上に置き反応を停止させた。

【0041】

その後、正方形に切ったDE81紙に反応液を滴下し、乾燥させた後、ビーカーの中に移して、未反応dTTPを溶解除去するために洗浄した。洗浄は、まず、5%リン酸水素二ナトリウム水溶液で3回行い、次いで、蒸留水で3回、更に、エタノールで2回行い、その後、乾燥した。このようにして得た乾燥DE81紙を、シンチレーターが入ったバイアルに入れ、シンチレーションカウンターで放射活性（cpm）を測定した。酵素サンプルの活性が強いほど、それで合成されるDNAに、放射性同位体で標識したdTTPがより多く取り込まれ、放射活性が高くなるので、これによりタンパク質の活性を判定した。

【0042】

(c) リゾチームの活性測定

基質に細菌M. lysodeikticusを選び、これを50mMリン酸バッファーで懸濁し、0.16mg/ml濃度の基質溶液を調製した。この基質溶液480μlに20μlのタンパク質（酵素リゾチーム）溶液を加え、室温で30分間インキュベートした。その後、波長450nmの吸光度を測定した。

リゾチームは、細菌の細胞壁を分解する能力があるので、その能力、すなわち、活性が高いほど吸光度は減少する。リゾチーム活性1 unitは、1分間あたりに450nmの吸光度が0.001減少することと定義した。

【0043】

(d) トポイソメラーゼI活性測定

0.5μgのsupercoiled pBR322と、トポイソメラーゼ (Topoisomerase) Iタンパク質を反応バッファー（10mM TrisHCl, pH7.5, 150mM NaCl, 5mM β-mercaptoethanol, 0.5mM EDTA）に懸濁し、37℃で30分インキュベーションした後、0.1%SDSを添加し反応を停止した。次に、これに0.5μg/ml proeinase Kを添加し、37℃で30分インキュベーションし、液中のタンパク質トポイソメラーゼIを分解した。この後、この液を、1%(w/v)アガロースで電気泳動し、0.5μg/mlのエチジウムブロマイドでDNA染色し、UVトランスイルミネーターで上方にシフトしたDNAのバンドを確認することによって、トポイソメラーゼI活性測定を行った。

【0044】

上記手順・操作で得られた本実施例の結果である、活性（リフォールディング率）、タンパク質回収率を、表1及び表2に、比較例の結果を、表3に纏めた。実施例に示されるように、リフォールディングにより、DNA結合活性等のタンパク質本来の活性が得られることが分かった。本発明のゼオライトベータは、種々の高次構造未形成並びに変性・失活タンパク質に適用できる、一般性、普遍性の高い、リフォールディング剤として有用であり、その適用は、実施例に示されたタンパク質に限定されるものではなく、任意のタンパク質に適用し得るものである。

【0045】

【表1】

実施例	機能賦活剤	タンパク質	活性(リフォールディング率):タンパク質回収率	備考
1	未形成ゼオライトベータ(BE:アミン)TEA含有	RPA70(黄色)ゾグゾグI由来	DNA結合活性有(大)	大腸菌で合成し沈殿したものを使用、分子量66kDa
2	同上	同上	DNA結合活性有(中)	
3	同上	同上	DNA結合活性有(小)	
4	同上	同上	DNA結合活性有(大):約90%; 20%	
5	同上	同上	DNA結合活性有(大)	
6	同上	同上	DNA結合活性有(大)	
7	同上	同上	DNA結合活性有(大):約80%; 16%	
8	同上	同上	DNA結合活性有(大):95%強; 23%	
9	同上	同上	DNA結合活性有(大):約95%; 22%	
10	同上	同上	DNA結合活性有(大):90%強; 19%	
11	同上	同上	DNA結合活性有(小)	
12	同上	同上	DNA結合活性有(大)	
13	同上	同上	DNA結合活性有(大):100%	
14	同上	同上	DNA結合活性有(大):100%	
15	同上	同上	DNA結合活性有(大):約100%	
16	同上	同上	DNA結合活性有(中):49.3%	
17	同上	同上	DNA結合活性有(中):84.7%	
18	同上	同上	DNA結合活性有(中):84.4%	
19	同上	同上	DNA結合活性有(中):38.2%	
20	同上	同上	DNA結合活性有(大):72.2-77.4%	
21	同上	同上	DNA結合活性有(小):24.3%	
22	同上	同上	DNA結合活性有(大)	大腸菌で合成し沈殿したものを使用、分子量110kDa
23	同上	同上	DNA結合活性有(大)	大腸菌で合成し沈殿したものを使用
24	同上	市販品リザーブタンパク質(ニグ リザーブタンパク質)	DNA結合活性有(大)	大腸菌で合成した可溶性のもの(分子量39kDa)を6M塩酸7-ニグリンと20mM 2-メルカプトエタノールで変性(ホリダーゼ活性: 0 OPIM) 6M塩酸7-ニグリンと20mM 2-メルカプトエタノールで変性(活性unitは0)、分子量14kDa
25	同上	市販品リザーブタンパク質(ニグ リザーブタンパク質)	DNA結合活性有(大)	

【0046】

【表2】

機能賦活剤	タンパク質	活性(リフォolding率):タンパク質回収率	備考
実施例 26	焼成ゼオライトベータ	RPA70(黄色ゾグゾグハエ由来)	焼成条件: 300°C/10h
実施例 27	同上	同上	焼成条件: 400°C/8h
実施例 28	同上	同上	焼成条件: 450°C/6h
実施例 29	同上	同上	焼成条件: 500°C/3h
実施例 30	未焼成ゼオライトベータ(BE:アミンTEA含有)	同上	
実施例 31	同上	DNA ポリメラーゼδ (イネ由来)	DNA結合活性有(大)
実施例 32	ゼオライトベータ(no template:アミンなし)	DNA ポリメラーゼδ (イネ由来)	DNA結合活性有(大)
実施例 33	ゼオライトベータ(アミン:TBA)	アミノ酸配列1-50欠損	DNA結合活性有(大)
実施例 34	ゼオライトベータ(アミン:TMA)	RPA70(黄色ゾグゾグハエ由来)	DNA結合活性有(小)
実施例 35	ゼオライトベータ(アミン:TEA)	同上	DNA結合活性有(小)
実施例 36	ゼオライトベータ(アミン:TPA)	同上	DNA結合活性有(小)
実施例 37	ゼオライトベータ(アミン:ピリジン)	同上	DNA結合活性有(小)
実施例 38	Si-rich BEA	RPA70(黄色ゾグゾグハエ由来)	DNA結合活性有(小)
実施例 39	Al-rich BEA	同上	DNA結合活性有(小)
実施例 40	Co BEA	同上	DNA結合活性有(小)
実施例 41	Ti BEA	同上	DNA結合活性有(小)
実施例 42	BEA-アンモニウム	同上	DNA結合活性有(小)
実施例 43	BEA-原素	同上	DNA結合活性有(小)
実施例 44	NaBEA, 135°C, 27h	同上	DNA結合活性有(小)
実施例 45	NaBEA, 96h	同上	DNA結合活性有(小)
実施例 46	NaBEA	同上	DNA結合活性有(小)
Topoisomerase (黄色ゾグゾグハエ由来)		DNA relax活性有(大): 89%	

分子量: 112kD。活性の比較は大腸菌で可溶性画分でとれたものを使用。Refoldingしたものは、大腸菌で合成し沈殿したものを使用。

【00047】

【表 3】

機能賦活剤	タンパク質	活性(リポソーム):タンパク質回収率	備考
ゼオライト K-LTL	RPA70(黄色ゾウゾウハエ由来)	DNA結合活性無	
ゼオライト H-Y	同上	DNA結合活性無	
ゼオライト H-USY330	同上	DNA結合活性無	
ゼオライト H-USY360	同上	DNA結合活性無	
ゼオライト K-FER	同上	DNA結合活性無	Na-Li-SX:低シリカゼオライトX
Na-LSX	同上	DNA結合活性無	
RUB-15	同上	DNA結合活性無	
Na-FAU	同上	DNA結合活性無	HOM:メソポーラスシリケートの1種
カネマイト⑤	同上	DNA結合活性無	
HOM(pore 7nm)	同上	DNA結合活性無	
HOM(pore 5nm)	同上	DNA結合活性無	
HOM(pore 6nm)	同上	DNA結合活性無	PLS:層状シリケートの1種
PLS	同上	DNA結合活性無	
MCM-22	同上	DNA結合活性無	
FER-TEA	同上	DNA結合活性無	
MOR-TEA	同上	DNA結合活性無	
FER-ゼリジン	同上	DNA結合活性無	
ゼオライトベータ構造			
未形成シリカ(BEA	同上	DNA結合活性無	
135°C, 24h)J			
GaBEA			
比較例 1			
比較例 2			
比較例 3			
比較例 4			
比較例 5			
比較例 6			
比較例 7			
比較例 8			
比較例 9			
比較例 10			
比較例 11			
比較例 12			
比較例 13			
比較例 14			
比較例 15			
比較例 16			
比較例 17			
比較例 18			
比較例 19			
比較例 20			

【0048】

【表 4】

		リフォルディングバッファー	
		50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォルディング因子/非イオン系界面活性剤	
実施例	1	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォルディング因子無/1(v/v)% Tween 20	
実施例	2	50mM HEPES pH7.5/0.2M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォルディング因子無/1(v/v)% Tween 20	
実施例	3	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォルディング因子無/1(v/v)% Tween 20	
実施例	4	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	5	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Triton X-100	
実施例	6	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% NP-40	
実施例	7	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/0.5(v/v)% Tween 20	
実施例	8	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/2(v/v)% Tween 20	
実施例	9	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/3(v/v)% Tween 20	
実施例	10	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5%(w/v)PEG20K/5(v/v)% Tween 20	
実施例	11	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/10(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	12	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/5.0(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	13	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	14	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	15	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PEG3350/1(v/v)% Tween 20	
実施例	16	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/10.0(w/v)%PEG200/1(v/v)% Tween 20	
実施例	17	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	18	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PPG2000/1(v/v)% Tween 20	
実施例	19	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/5.0(w/v)%PPG400/1(v/v)% Tween 20	
実施例	20	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0-5.0%Ficoll70/1(v/v)% Tween 20	
実施例	21	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.1% β -cyclodextrin/1(v/v)% Tween 20	
実施例	22	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	23	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	24	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	
実施例	25	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	

【0049】

【表 5】

リフォレンジングバップアー

実施例 26	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタールリフォレンジング因子/非イオン系界面活性剤
実施例 27	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 28	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 29	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 30	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 31	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/2(v/v)% Tween 20
実施例 32	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 33	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 34	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 35	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 36	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 37	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 38	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 39	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 40	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 41	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 42	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 43	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 44	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 45	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20
実施例 46	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトイタール/0.5%(w/v)PEG20K/1(v/v)% Tween 20

【0050】

【表 6】

リフォールディングバッファー		リフォールディング因子/非イオン系界面活性剤	
比較例 1	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 1	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 2	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 2	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 3	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 3	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 4	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 4	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 5	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 5	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 7	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 7	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 8	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 8	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 9	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 9	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 10	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 10	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 11	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 11	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 12	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 12	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 13	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 13	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 14	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 14	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 15	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 15	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 16	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 16	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 17	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 17	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 18	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 18	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 19	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 19	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20
比較例 20	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20	比較例 20	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20

【産業上の利用可能性】

【0051】

以上詳述したように、本発明は、不活性タンパク質の機能賦活剤並びに機能賦活方法に係わるものであり、本発明によって、大腸菌等の発現系で産生された高次構造が未形成なために、不活性なタンパク質、あるいは、ある種の原因で立体構造が変化して失活したタンパク質の本来の機能・活性をリフォールディングにより賦活させることができる。この方法は、インクルージョンボディを効率よくリフォールディングする方法として有用である。種々のタンパク質に適用可能な、一般性、普遍性のある、しかも、リフォールディング率の高い、効率的なリフォールディングキットと、その使用方法を提供できる。本発明のキットの、必須成分であるリフォールディング剤を構成するゼオライトベータは、低コストであり、しかも、繰り返し使用が可能である。このリフォールディングキットは、分

子量10万を越える大型のタンパク質を含む種々の立体構造無秩序タンパク質のリフォールディングに効力を有する。したがって、更なる展開、例えば、大腸菌の発現系によるタンパク質合成プロセスと、本発明のキット並びにその使用法とを組み合わせることにより、高次構造の制御された該タンパク質固有の本来機能が備わったタンパク質を生産する、新規の活性タンパク質製造プロセス・システムを構築することができる。

【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 大腸菌等で生産した高次構造未形成による不活性タンパク質、又は、ある種の原因で立体構造が変化し失活したタンパク質の機能賦活(リフォールディング)に対して、効果的な試剤キット、並びにその使用方法及びそれを用いた不活性タンパク質の機能賦活方法を提供する。

【解決手段】 高次構造が無秩序なため、不活性であるタンパク質の高次構造を整え、活性にする、タンパク質の機能賦活操作・工程で用いる試剤キットであって、B E A構造のゼオライト(ゼオライトベータ)からなるリフォールディング剤を構成要素として含むことを特徴とするタンパク質リフォールディングキット、及びそれを用いた不活性タンパク質の機能賦活方法。

【効果】 鎖長の長短を問わず、種々の高次構造未形成並びに変性・失活タンパク質に適用可能な、一般性、普遍性の高い、しかも、繰り返し使用可能な低コスト、高効率のリフォールディングが可能な新規リフォールディングキットを提供できる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 0 0 5 3 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 1 0 2 1 5 3 3]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所